两个八仙花品种花色苷的提取、鉴定和理化稳定性

李清韵，唐倩雯，陈冠群，申晓辉*

（上海交通大学 设计学院，上海 200240）

摘要：为优化八仙花花色苷提取条件，探究具有不同花色可调性的八仙花花色苷组分和理化稳定性差异，初步解释八仙花花色可调性存在差异的原因，该文以花色不可调的‘蒂亚娜（Tijana）’和花色可调的‘拉维布兰（Ravi Brent）’八仙花（*Hydrangea macrophylla*）为试验材料，通过 L_9（3^3）正交试验确定了超声波法提取花色苷的最优条件，利用 UPLC-Q-TOF-MS 法进行花色苷组分的鉴定，并且探究了离体条件下温度、光照、金属离子和糖类对八仙花花色苷理化稳定性的影响。结果表明：（1）花色苷提取的最优条件是：‘蒂亚娜’和‘拉维布兰’的乙醇浓度分别为 70 %、80 %，料液比均为 1∶20，提取时间均为 20 min。（2）二者的主要花色苷组分均为飞燕草素-3-*O*-葡萄糖苷。（3）八仙花花色苷在温度≤70 ℃暗处保存效果更好。（4）花色不可调的‘蒂亚娜’八仙花花色苷对光照、糖类和大多数金属离子更稳定；只有花色可调的‘拉维布兰’八仙花花色苷加入中低浓度（10~30 mmol·L^{-1}）Al^{3+} 后由粉色变为蓝色且稳定性提高，而‘蒂亚娜’并无此颜色变化，表明八仙花花色可调性的差异与其理化稳定性有关。以上研究结果为八仙花花色苷提取、保存、花色改良以及干燥花护色等提供了理论依据。

关键词：八仙花，花色苷，超声提取，鉴定，理化稳定性

中图分类号：S685　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**

Extraction, identification and physical-chemical stability of anthocyanins from two *Hydrangea* varieties

LI Qingyun, TANG Qianwen, CHEN Guanqun, SHEN Xiaohui*

(*School of Design, Shanghai Jiao Tong University*, Shanghai 200240, China)

Abstract: To explain the reason for different flower color adjustability of *Hydrangea macrophylla*, non-adjustable color ‘Tijana’ and adjustable color ‘Ravi Brent’ of *Hydrangea macrophylla* are used as experimental materials. The extraction conditions were optimized and the components of *Hydrangea macrophylla* anthocyanins were measured. Their physical and chemical stability were also explored, aiming to explore the mechanism of flower color adjustability. The optimal extraction conditions of *Hydrangea* anthocyanins by the ultrasonic method were determined through L_9（3^3）orthogonal experiments. The anthocyanin components were separated and identified by UPLC-Q-TOF-MS. And the effects of temperature, light, metal ions and sugars on the physical and chemical stability of *Hydrangea* anthocyanins were also explored *in vitro* conditions. The results were as follows: (1) The optimal conditions for extraction of *Hydrangea macrophylla* anthocyanins were that the ethanol concentration for ‘Tijana’ and ‘Ravi Brent’ was 70 % and 80 % respectively, which was the only difference; the ratio of plant material to extraction solution was both 1∶20; and the extraction time was both 20 minutes. (2) The main anthocyanin component of the two varieties was both Delphinidin 3-*O*-glucoside. (3) *Hydrangea* anthocyanins were more stable when stored below 70 °C and in the dark. (4) Both Cu^{2+} and Al^{3+} change the color of the

基金项目：国家自然科学基金委项目（31901351）；上海交通大学新进教师启动计划（19X100040088）[Supported by National Natural Science Foundation of China（31901351）; Shanghai Jiao Tong University’s New Faculty Start-up Plan（19X100040088）]。

作者简介：李清韵（1998-），硕士研究生，主要从事园林植物研究，(E-mail) li-qingyun@sjtu.edu.cn。

*通信作者：申晓辉，教授，博士生导师，主要从事园林植物种质资源超低温保存逆境生理及分子生物学研究，(E-mail）shenxh62@sjtu.edu.cn。

anthocyanin solution, and Cu^{2+} specifically improved the stability of the anthocyanin of 'Tijana'. 10-90 mmol·L^{-1} Ca^{2+}, Al^{3+} and 90 mmol·L^{-1} Mg^{2+} had significant effects on the stability of anthocyanin of both varieties. Glucose, maltose, sucrose, galactose and 8 %-10 % concentration of rhamnose increased the stability of the non-adjustable color 'Tijana' *Hydrangea* anthocyanin. While 4 %-10 % concentration of rhamnose promotes the stability of adjustable color 'Ravi Brent' *Hydrangea* anthocyanin. The non-adjustable color 'Tijana' of *Hydrangea macrophylla* anthocyanins were more stable to light, sugars and most metal ions, compared with the adjustable color 'Ravi Brent'. Only the anthocyanins of the adjustable color 'Ravi Brent' of *Hydrangea macrophylla* turn from pink to blue. And its stability increased after adding low medium concentration (10-30 mmol·L^{-1}) of Al^{3+}. However, the non-adjustable color 'Tijana' of *Hydrangea macrophylla* did not have this kind of color change, indicating that the difference in color adjustability of *Hydrangea* flowers is related to its physical and chemical stability. These results provide a theoretical basis for the extraction and utilization of *Hydrangea* anthocyanins, flower color improvement and dry flower color protection.

Key words: *Hydrangea macrophylla*, anthocyanins, ultrasonic extraction, identification, physical-chemical stability

八仙花（*Hydrangea macrophylla*）别名绣球，为虎耳草科（Saxifragaceae）八仙花属（*Hydrangea*）落叶灌木，品种繁多且花色丰富，是切花、盆花及园林景观中的重要观赏植物。目前对于八仙花花色的研究多集中于单个品种的花色苷提取（刘晓东等，2011）、稳定性分析（贾洪菊，2011）或某些品种间的花色苷组分鉴定（龚仲幸等，2017；Li X, et al., 2019; Yoshida K, et al., 2021）等。八仙花花色丰富且在人工栽培条件下具有一定的可调性。蓝色八仙花多由粉色品种转变而成，此类八仙花称为花色可调（刁春武等，2017；杨娟等，2019）；另一部分粉色八仙花的花色始终为粉色，即花色不可调（邓衍明等，2018）。Oyama et al.(2015)和 Kodama et al.(2016)均发现，在 pH 4.0 条件下，Al^{3+}、1, 5-*O*-咖啡酰奎宁酸、2, 5-*O*-香豆酰奎宁酸与飞燕草素-3-*O*-葡萄糖苷（Delphinidin-3-*O*-glucoside）形成蓝色复合物；Li et al.(2019)则发现在含铝的酸性土壤中，这种蓝色复合物的产生使得八仙花由红色变为蓝色; Yoshida et al.(2021)进一步研究发现，不同花色的八仙花具有相同的花色苷组分，花色的差异源于液泡内 pH 和金属离子等因素的差异。

目前既有研究初步揭示了八仙花存在花色可调的现象，但对造成八仙花不同品种间花色可调性差异的机制还缺乏较为系统深入的研究。因此，本文选择花色不可调的‘蒂亚娜（Tijana）’八仙花和花色可调的‘拉维布兰（Ravi Brent）’八仙花为实验材料，通过 L_9（3^3）正交试验设计确定超声波法提取花色苷的最优条件，利用液质联用（UPLC-Q-TOF-MS）法进行花色苷组分的鉴定，通过分光光度计测定吸光度值探究了离体条件下温度、光照、金属离子和糖类对八仙花花色苷理化稳定性的影响，拟探讨以下问题：（1）超声波法提取八仙花花色苷的最优条件是什么？（2）花色可调/不可调性的八仙花花色苷组分有何差异？（3）影响八仙花花色苷稳定性的因素在花色可调/不可调性之间有无差异？以期为八仙花花色改良、花色苷保存应用和干燥花护色提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料采集与预处理

2020 年 1 月，于上海市闵行区某鲜花店购买花色不可调和可调为蓝色的粉色系八仙花品种‘蒂亚娜’（图 1 左）和‘拉维布兰’（图 1 右）切花为实验材料。各选取 5 支花色相同、形态相似且完全盛开的花枝，随机选取不同花枝上性状相似的萼片，每份称取鲜重 1.000 g。



图 1 室内自然光照条件下的‘蒂亚娜’（左）和‘拉维布兰’（右）八仙花切花

Fig.1 Cut flower of ‘Tijana’ (left) and ‘Ravi Brent’ (right) *Hydrangea macrophylla* under the indoor natural lighting

1.2 方法

1.2.1 两个品种八仙花花色苷提取条件的优化

利用 L_9（3^3）正交试验设计乙醇浓度（%）、料液比（g·mL^{-1}）、提取时间（min），在不高于 55 ℃的提取温度下优化八仙花花色苷的最佳提取条件（详见表 1）。

表 1 L_9（3^3）正交试验设计优化两个八仙花品种的花色苷提取条件

Table 1 L_9（3^3） orthogonal experiment for optimizing extraction conditions of anthocyanins of *Hydrangea macrophylla*

水平 Level	因素 Factors		
	A 乙醇浓度 Ethanol concentration (%)	B 料液比 Material-to-liquid ratio (g·mL^{-1})	C 提取时间 Extraction time (min)
1	60	1∶20	20
2	70	1∶30	30
3	80	1∶40	40

注：料液比为八仙花萼片样品鲜重与提取液体积的比；提取时间=超声时间+间隔时间，其中每超声 10s 间隔 10s。

Note: Material-to-liquid ratio refers to the ratio of fresh weight of *Hydrangea* flower sepal sample to volume of extracted solution. The extraction time is the sum of ultrasound time and interval time, in which each ultrasound lasts for 10 s and then interval of 10 s.

提取方法参照孙卫等（2010）和 Park et al.(2014)的方法并略作修改。将八仙花样品在液氮中研磨成粉末后，按表 1 中的提取条件进行超声法提取，得到花色苷提取液。

采用 pH 示差法对八仙花花色苷提取液中花色苷含量进行测定，参照徐文秀和刘俊（2020）的方法并略作修改；利用如下 Fuleki 公式（1968）计算花色苷含量：

$$A = (A_X - A_{700})\ \mathrm{pH}\ 1.0 - (A_X - A_{700})\ \mathrm{pH}\ 4.5; \quad (1)$$

$$C = A/\varepsilon/\mathrm{L} \times \mathrm{M} \times DF \times V/W \quad (2)$$

式中：A：吸光度值，A_x、A_{700}分别为最大吸收波长和 700 nm 处的吸光度值；C：花色苷含量（mg·g^{-1} FW）；ε：矢车菊素-3-*O*-葡萄糖苷的摩尔消光系数（26900）；L：光程（1 cm）；M：花色苷分子质量（449.2）；*DF*：稀释倍数；*V*：体积（mL）；*W*：样品质量（g）。

1.2.2 两个品种八仙花花色苷组分分离鉴定

花色苷组分的分离鉴定参照郁晶晶等（2020）的方法并略作修改。采用超高效液相色谱-离子淌度-四极杆飞行时间质谱联用仪（ACQUITY I class UPLC / 2D H class & Vion IMS QTOF MS，上海沃特世科技有限公司）对八仙花花色苷组分进行鉴定分析。含有矢车菊素-3-*O*-葡萄糖苷（Cyanidin-3-*O*-glucoside）和飞燕草素-3-*O*-葡萄糖苷等 13 种花色苷的混合标准品（European Pharmacopoeia Reference Standard）购

自法国 EDQM 公司。

UPLC 分析条件：柱温 45℃，流速 0.4 mL·min^{-1}，进样体积 3 μL；流动相 A 液：0.1 %甲酸溶液（$V_{甲酸}$∶$V_{水}$=0.1∶99.9）；流动相 B 液：含 0.1% 甲酸乙腈（$V_{甲酸}$∶$V_{乙腈}$=0.1∶99.9）。梯度洗脱程序：0 min，95 % A，5 % B；3 min，80 % A，20 % B；10 min，0 % A，100 % B；12 min，0 % A，100 % B；15 min，5 % A，95 % B；19 min，5 % A，95 % B。

质谱分析条件：电喷雾电离，正离子检测模式，扫描范围为 50 ~ 1 000 m·z^{-1}，扫描速度为 0.2 s；毛细管电压 2000 V，锥孔电压 40 V，雾化气温度 450 ℃，雾化气流量 900 L·h^{-1}，锥孔反吹气 50 L·h^{-1}，离子源温度 115 ℃。

1.2.3 两个八仙花品种花色苷稳定性的影响因素分析

基于 1.2.1 的优化条件进行两个八仙花品种花色苷的提取；花色苷的理化稳定性分析参照贾洪菊（2011）和昝立峰等（2017）的方法并略作修改。为排除金属离子和糖类改变花色苷结构而影响最大吸收波长，故先在 500~600 nm 波长范围内进行各处理组扫描，根据吸光度值 A 确定最大吸收波长。

1.2.3.1 温度对花色苷稳定性的影响

利用紫外-可见分光光度计测定室温条件下花色苷提取液的吸光度 A_0；将花色苷提取液分别置于 30~100 ℃水浴锅中加热 1 h，测定最大吸收波长处的吸光度值 A_T，计算保存率并绘制成图。

$$保存率/\%=(A_T/A_0)\times 100 \quad (3)$$

式中：A_T为在温度 T 下处理 1h 后的吸光度；A_0为室温下的吸光度。

1.2.3.2 光照对花色苷稳定性的影响

将花色苷提取液置于室内自然光（光照强度为 1000 Lux）和黑暗（黑布包裹）环境下，并于 0、1、2、4、8 和 16 d 后测定最大吸收波长处的吸光度值，计算保存率并绘制成图。

$$保存率/\%=(A_t/A_0)\times 100 \quad (4)$$

式中：A_t为在时间 t 时的吸光度；A_0为在时间 0 时的吸光度。

1.2.3.3 金属离子对花色苷稳定性的影响

向花色苷提取液中加入等体积的 4 个浓度（0、10、30 和 90 mmol·L^{-1}）$MgCl_2$、$CaCl_2$、$AlCl_3$ 和 $CuCl_2$ 溶液，观察溶液颜色变化并测定最大吸收波长处的吸光度值，计算保存率并绘制成图。

$$保存率/\%=(A_c/A_0)\times 100 \quad (5)$$

式中：A_c为加入浓度为 c 的金属离子溶液后的吸光度；A_0为等体积纯水后的吸光度。

1.2.3.4 糖类对花色苷稳定性的影响

向花色苷提取液中加入等体积的不同质量分数（0、2 %、4 %、6 %、8 %和 10 %）葡萄糖、麦芽糖、蔗糖、半乳糖和鼠李糖溶液，观察溶液颜色变化并测定最大吸收波长处的吸光度值，计算保存率并绘制成图。

$$保存率/\%=(A_c/A_0)\times 100 \quad (6)$$

式中：A_c为加入质量分数为 c 的糖类溶液后的吸光度；A_0为加入等体积纯水后的吸光度。

1.3 数据分析

每个处理进行 3 次生物学重复。采用 Microsoft Office Excel 2016 软件进行数据整理、分析，采用 IBM SPSS Statistics 25 软件进行正交试验极差分析、方差分析和估算边际平均值计算，采用 GraphPad Prism 8 软件绘图。

2 结果与分析

2.1 两个八仙花品种花色苷超声波法最佳提取条件的优化

对表 1 正交试验中各提取条件下的花色苷含量进行极差分析和方差分析（表 2-4）。结果表明，处理组合 1（60 %乙醇+1∶20 料液比+20 min 提取时间）为正交试验中的最佳提取条件，‘蒂亚娜’和‘拉维布兰’八仙花花色苷含量最高可达 63.678 μg·g^{-1} FW 和 149.177 μg·g^{-1} FW；3 个提取条件对花色苷提取量

的影响顺序依次是料液比>提取时间>乙醇浓度，其中料液比对花色苷含量的影响最大，达到极显著差异；提取时间的影响则达到显著或极显著差异；乙醇浓度对‘蒂亚娜’八仙花花色苷含量影响不显著。

表 2 超声波法提取‘蒂亚娜’八仙花花色苷的含量及极差分析

Table 2 The contents of anthocyanins and range analysis from ‘Tijana’ *Hydrangea macrophylla*

编号 No.	A 乙醇浓度 Ethanol concentration (%)	B 料液比 Material-to-liquid ratio (g·mL^{-1})	C 提取时间 Extraction time (min)	花色苷含量 Anthocyanin content ACY (μg·g^{-1} FW)
1	1（60）	1（1∶20）	1（20）	63.678
2	1	2（1∶30）	2（30）	45.087
3	1	3（1∶40）	3（40）	37.851
4	2（70）	1	2	61.229
5	2	2	3	45.087
6	2	3	1	44.530
7	3（80）	1	3	53.436
8	3	2	1	50.097
9	3	3	2	31.171
k1	48.872	59.447 666 67	52.768 333 33	
k2	50.282	46.757	45.829	
k3	44.901 333 33	37.850 666 67	45.458	
R	5.380 666 667	21.597	7.310 333 333	

表 3 超声波法提取‘拉维布兰’八仙花花色苷含量及极差分析

Table 3 The contents of anthocyanins and range analysis from ‘Ravi Brent’ *Hydrangea macrophylla*

编号 No.	A 乙醇浓度 Ethanol concentration (%)	B 料液比 Material-to-liquid ratio (g·mL^{-1})	C 提取时间 Extraction time (min)	花色苷含量 Anthocyanin content ACY (μg·g^{-1} FW)
1	1（60）	1（1∶20）	1（20）	149.177
2	1	2（1∶30）	2（30）	116.892
3	1	3（1∶40）	3（40）	122.458
4	2（70）	1	2	148.063
5	2	2	3	106.873
6	2	3	1	142.497
7	3（80）	1	3	148.063
8	3	2	1	138.601
9	3	3	2	149.177
k1	129.509	148.434 333 3	143.425	
k2	132.477 666 7	120.788 666 7	138.044	
k3	145.280 333 3	138.044	125.798	
R	15.771 333 33	27.645 666 67	17.627	

表 4 ‘蒂亚娜’和‘拉维布兰’八仙花正交试验结果的方差分析

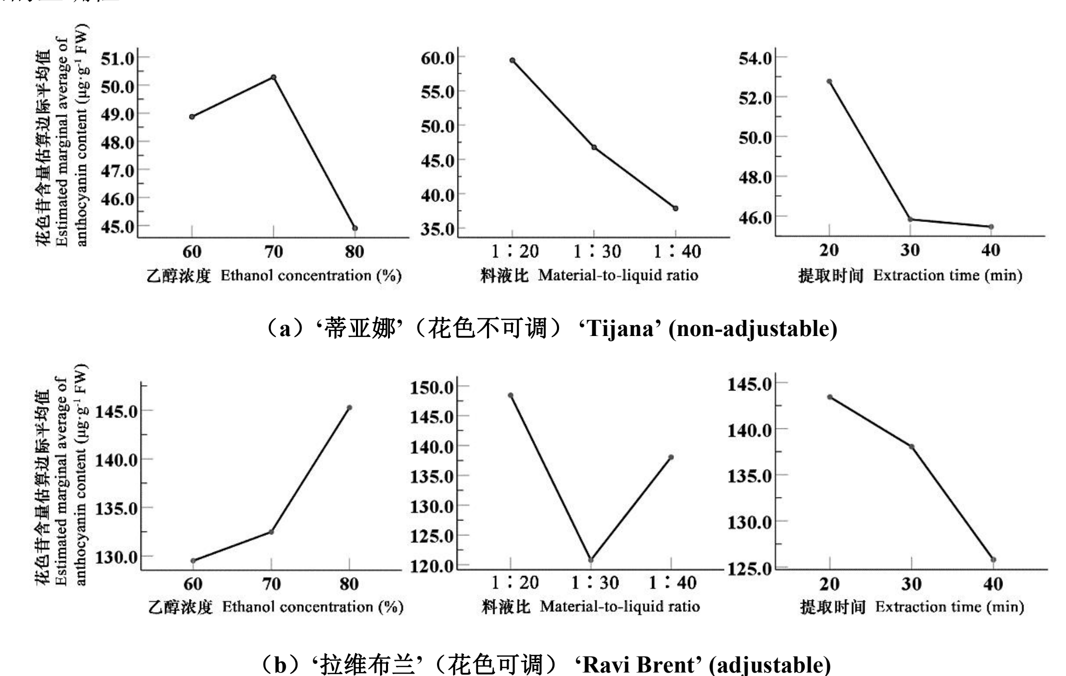
Table 4 Variance analysis of orthogonal test of ‘Tijana’ and ‘Ravi Brent’ *Hydrangea macrophylla*

品种 Variety	变异来源 Source of variation	离均差平方和 Sum of squared deviations	自由度 Degree of freedom	均方 Mean square	F 值 F value	显著水平 Significant level
‘蒂亚娜’ ‘Tijana’	乙醇浓度 Ethanol concentration（%）	46.706	2	23.353	3.17	
	料液比 Material-to-liquid ratio	706.806	2	353.403	47.968	**
	提取时间 Extraction time（min）	101.733	2	50.866	6.904	*
	误差 Error	14.735	2	7.368		
	总和 Sum	869.98	8			
‘拉维布兰’ ‘Ravi Brent’	乙醇浓度 Ethanol concentration（%）	421.456	2	210.728	165.562	**
	料液比 Material-to-liquid ratio	1 169.988	2	584.994	459.609	**
	提取时间 Extraction time（min）	489.631	2	244.815	192.343	**
	误差 Error	2.546	2	1.273		
	总和 Sum	2 083.621	8			

注： *表示影响因素差异显著，**表示影响因素差异极显著。

Note: *Means significant differences in influencing factors, **means extremely significant differences in influencing factors.

根据表 2、3 的实验结果分别对影响‘蒂亚娜’和‘拉维布兰’八仙花花色苷含量的三个因素进行估算分析可知，‘蒂亚娜’八仙花花色苷的最优提取条件组合是 $A_2B_1C_1$，即乙醇浓度为 70 %，料液比为 1：20，提取时间为 20 min；而‘拉维布兰’八仙花花色苷提取的最优条件则是 $A_3B_1C_1$，即乙醇浓度为 80 %，料液比为 1：20，提取时间为 20 min；与表 2 的差异在于乙醇浓度由 60 %提高至 80 %。依据图 2 估算的最优组合条件进行 3 次重复性验证实验并取平均值，测得‘蒂亚娜’的花色苷含量为 70.135 μg·g^{-1} FW，而‘拉维布兰’的花色苷含量高达 153.630 μg·g^{-1} FW，均超过了表 2 中已知的最佳组合 $A_1B_1C_1$，验证了估算结果的正确性。



（a）‘蒂亚娜’（花色不可调） ‘Tijana’ (non-adjustable)

（b）‘拉维布兰’（花色可调） ‘Ravi Brent’ (adjustable)

图 2 基于正交试验结果估算三个因素对‘蒂亚娜’和‘拉维布兰’八仙花花色苷含量的影响

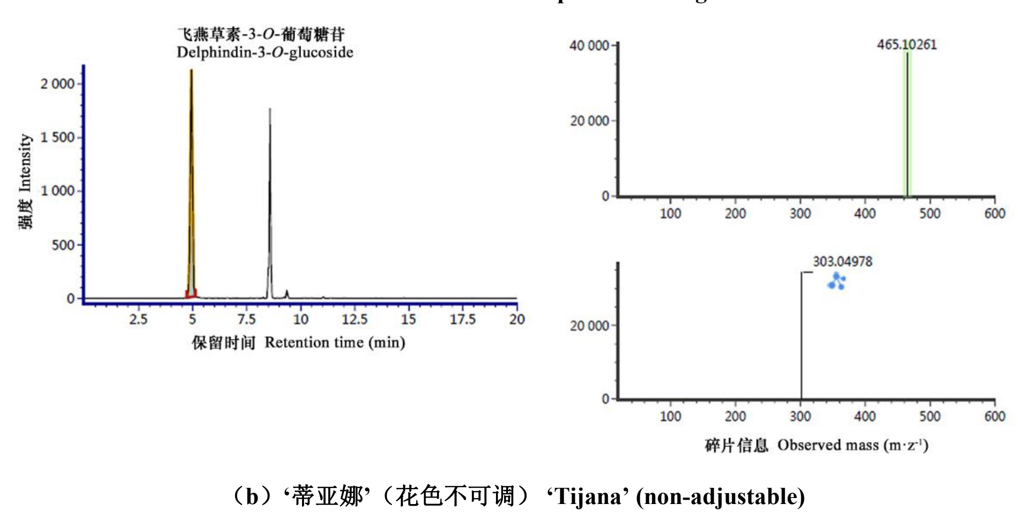
Fig.2 Effect of three factors in orthogonal test on the extraction of anthocyanins of *Hydrangea macrophylla*

2.2 两个八仙花品种花色苷的组分鉴定

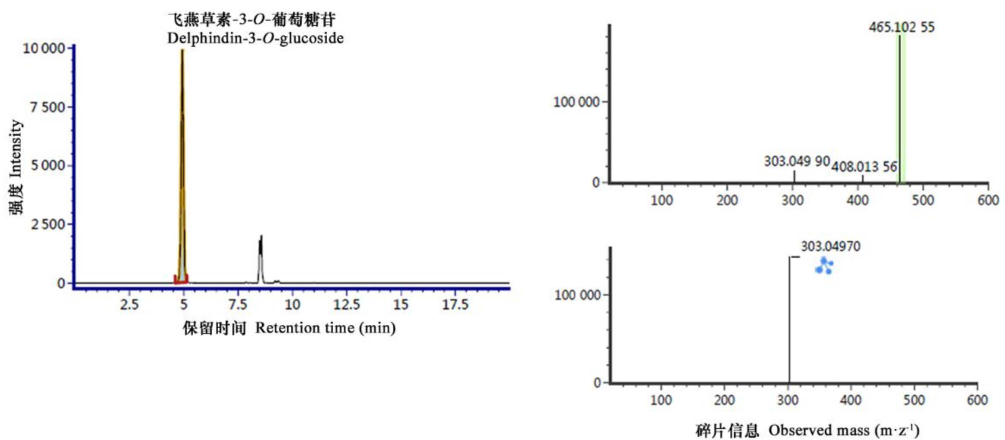
根据紫外-可见光谱吸收特征，在 520 nm 处检测得 1 种花色苷类物质；利用花色苷混合标准品和 UPLC-Q-TOF-MS 鉴定为飞燕草素-3-*O*-葡萄糖苷（图 3）。说明这两种八仙花的花色苷组分无差异，均只含飞燕草素-3-*O*-葡萄糖苷。

(a)飞燕草素-3-*O*-葡萄糖苷分子结构图（Schreiber HD, et al, 2011）

Molecular structure of Delphinidin 3-*O*-glucoside



（b）‘蒂亚娜’（花色不可调） ‘Tijana’ (non-adjustable)



（c）‘拉维布兰’（花色可调） ‘Ravi Brent’ (adjustable)

图 3 UPLC-Q-TOF-MS 法鉴定两个八仙花品种的花色苷组分

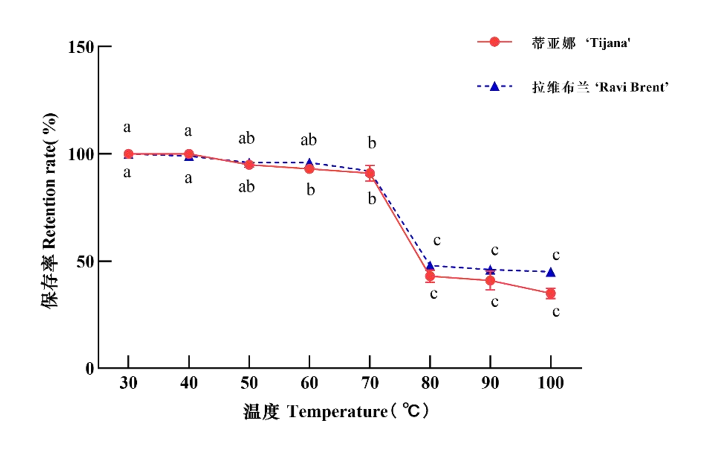
Fig.3 Identification of anthocyanin component in *Hydrangea macrophylla* with UPLC-Q-TOF-MS

2.3 离体条件下 4 种因素对两个八仙花品种花色苷理化稳定性的影响

基于 2.1 正交试验筛选出的最佳提取条件（70 % 和 80 %乙醇浓度，1∶20 料液比，20 min 提取时间），获得‘蒂亚娜’和‘拉维布兰’八仙花花色苷提取液；利用单因素随机区组实验设计研究 4 种因素（温度、光照和添加金属离子、糖分）对花色苷理化稳定性的影响。

2.3.1 温度

以室温下的八仙花提取液中的花色苷保存率为 100%（对照），‘蒂亚娜’和‘拉维布兰’八仙花提取液中的花色苷在 30~100 ℃保存率变化趋势基本相同，如图 4 所示。在≤40 ℃水浴中放置 1h 时保持稳定，在 40~70 ℃范围内略有下降，当温度≥ 80 ℃时则迅速下降至 100 ℃差异不显著，表明两个品种八仙花的花色苷热稳定性相近，且随着温度的升高稳定性下降，其中以 70 ℃以下保存最为适宜。



小写字母相同者表示在 0.05 水平下差异不显著。下同。

Those with the same lowercase letters have no significant difference at the 0.05 level. The same below.

图 4 水浴温度对两个八仙花品种提取液中花色苷稳定性的影响

Fig. 4 Effects of water bath temperatures on the stability of anthocyanins in *Hydrangea macrophylla*

2.3.2 光照条件

如图 5 所示，不论是光照还是避光条件下，两个八仙花品种的花色苷保存率均随着时间延长呈下降趋势，但‘蒂亚娜’明显高于‘拉维布兰’，表明花色不可调的‘蒂亚娜’的花色苷较花色可调的‘拉维布兰’更稳定。两个八仙花品种的花色苷避光保存时的保存率显著高于自然光照下，其中‘蒂亚娜’花色苷避光保存 16 d 时的保存率比室内自然光照条件高出 16.92 %，‘拉维布兰’则高出 44.11 %，表明花色可调的‘拉维布兰’较花色不可调的‘蒂亚娜’ 花色苷对光照更敏感。

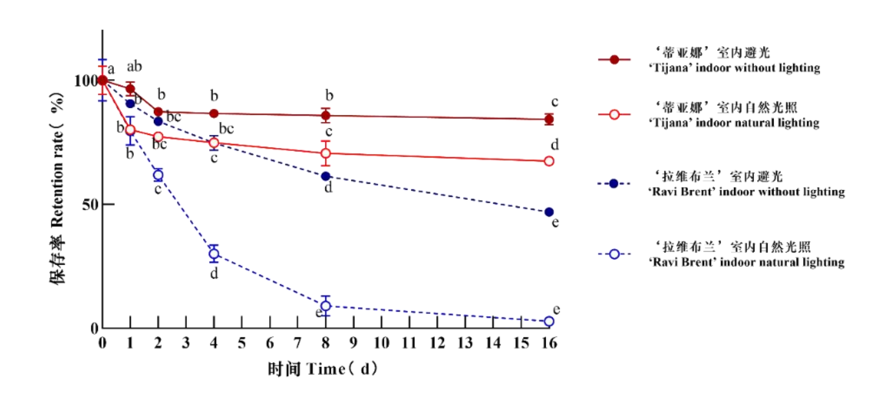


图 5 室内避光与自然光照下两个八仙花品种提取液中花色苷稳定性的影响

Fig. 5 Effects of indoor light conditions on the anthocyanin stability of *Hydrangea macrophylla*

2.3.3 金属离子

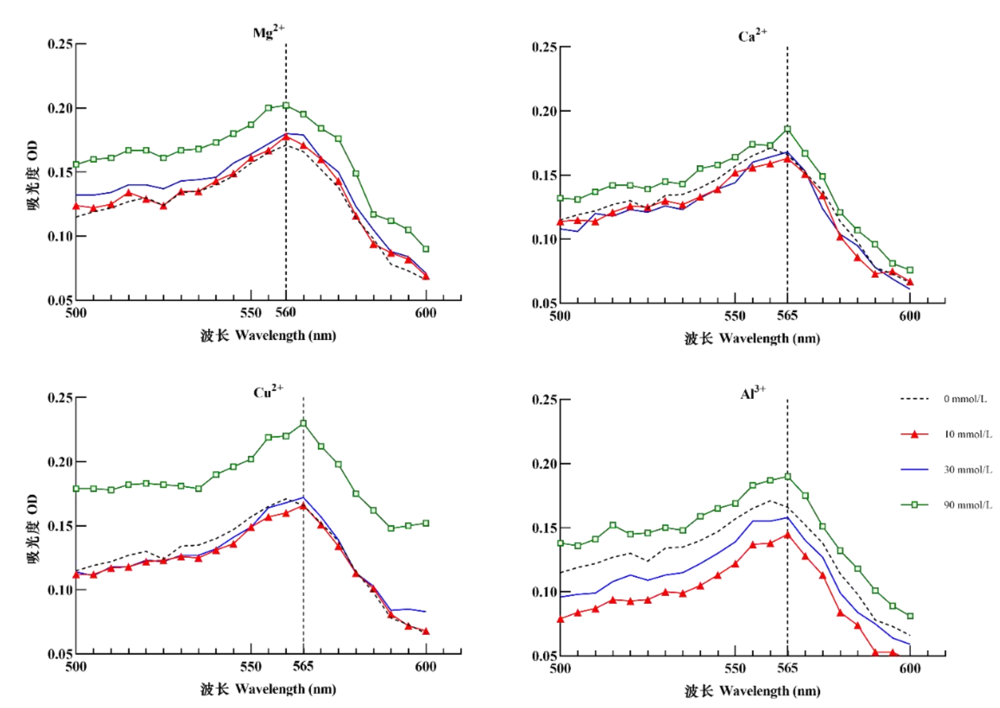
向两个八仙花品种的花色苷提取液加入等体积 90 mmol·L^{-1} $MgCl_2$、$CaCl_2$、$AlCl_3$ 和 $CuCl_2$ 溶液，观察金属离子对花色苷颜色的影响。只有加入 Cu^{2+} 后均会由粉色变为绿色；加入 Al^{3+} 会使‘蒂亚娜’提取液由浅粉色变为黄色，‘拉维布兰’提取液则由深粉色变为蓝紫色（表 5）。

表 5 金属离子对两个八仙花品种花色苷提取液颜色的影响

Table 5 Effects of metal ions on the color of anthocyanin extraction solution in *Hydrangea macrophylla*

品种 Variety	金属离子 Metal ion （90 mmol·L-1）	溶液颜色 Solution color
‘蒂亚娜’ ‘Tijana’	无 None	粉色 Pink
	Mg^{2+}	粉色 Pink
	Ca^{2+}	粉色 Pink
	Cu^{2+}	绿色 Green
	Al^{3+}	黄色 Yellow
‘拉维布兰’ ‘Ravi Brent’	无 None	粉色 Pink
	Mg^{2+}	粉色 Pink
	Ca^{2+}	粉色 Pink
	Cu^{2+}	绿色 Green
	Al^{3+}	蓝紫色 Blue purple

花色苷类物质的最大吸收波长一般在 500~600 nm 范围内。左玉和田芳（2014）的研究表明，某些金属离子或糖类可与花色苷形成复合物，使其吸收波长范围发生改变，从而引起颜色变化；有些甚至可能会对原有花色苷的物质结构造成破坏而使花色苷分解，使其在 500~600 nm 波长范围内不出现吸收峰。因此，在 500~600 nm 范围内对处理后的两种八仙花花色苷提取液进行全波长扫描，以确定最大吸收波长并测量吸光度，结果见图 6。‘蒂亚娜’（花色不可调）提取液加入 Mg^{2+} 后最大吸收波长仍为 560 nm；但加入 Ca^{2+}、Cu^{2+} 和 Al^{3+} 后，最大吸收波长均为 565 nm。



竖向虚线表示为最大吸收波长。下同。

Dotted line is the maximum absorption wavelength. The same below.

图 6 金属离子对‘蒂亚娜’八仙花提取液中花色苷最大吸收波长的影响

Fig. 6 Effect of metal ions on the maximum absorption wavelength of ‘Tijana’ *Hydrangea macrophylla*

花色可调的‘拉维布兰’八仙花提取液中的花色苷在加入 Mg^{2+} 和 Ca^{2+} 后最大吸收波长没有改变，仍为 540 nm；但加入 Cu^{2+} 后吸光度维持在一个较低的水平且无明显的吸收峰，表明花色苷与 Cu^{2+}螯合使其共轭体系发生了改变，吸收波长也发生了改变，从而使颜色发生改变；加入 Al^{3+} 后长波方向的吸收范围

增大导致提取液呈蓝色（图 7），这一结果与表 5 的观察结果相一致。

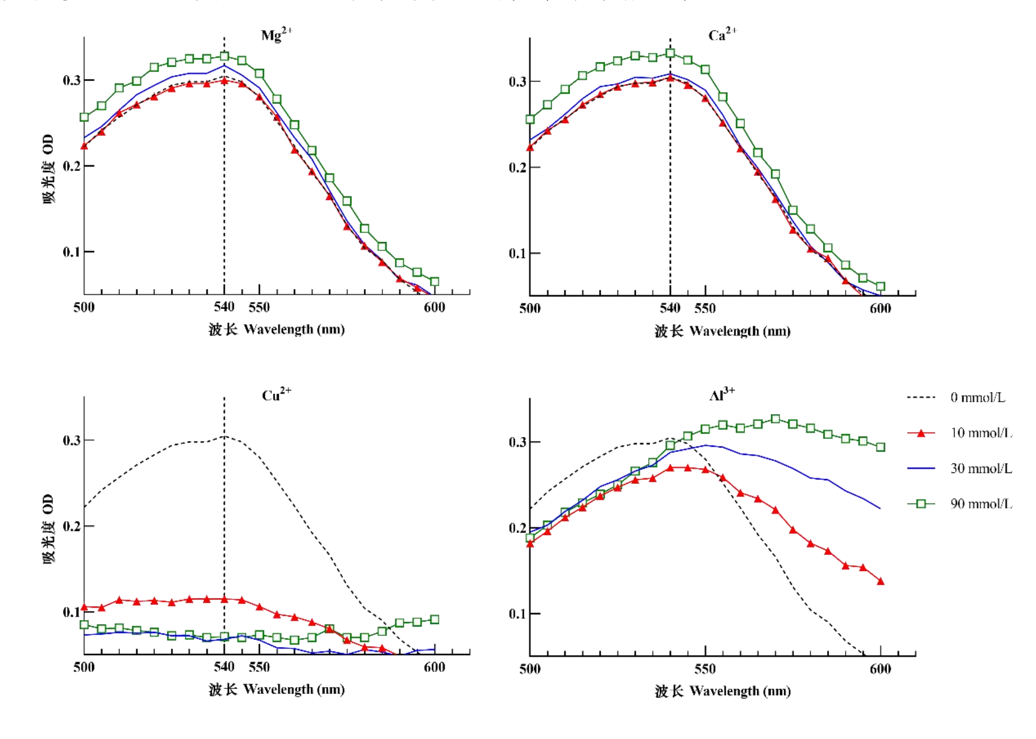
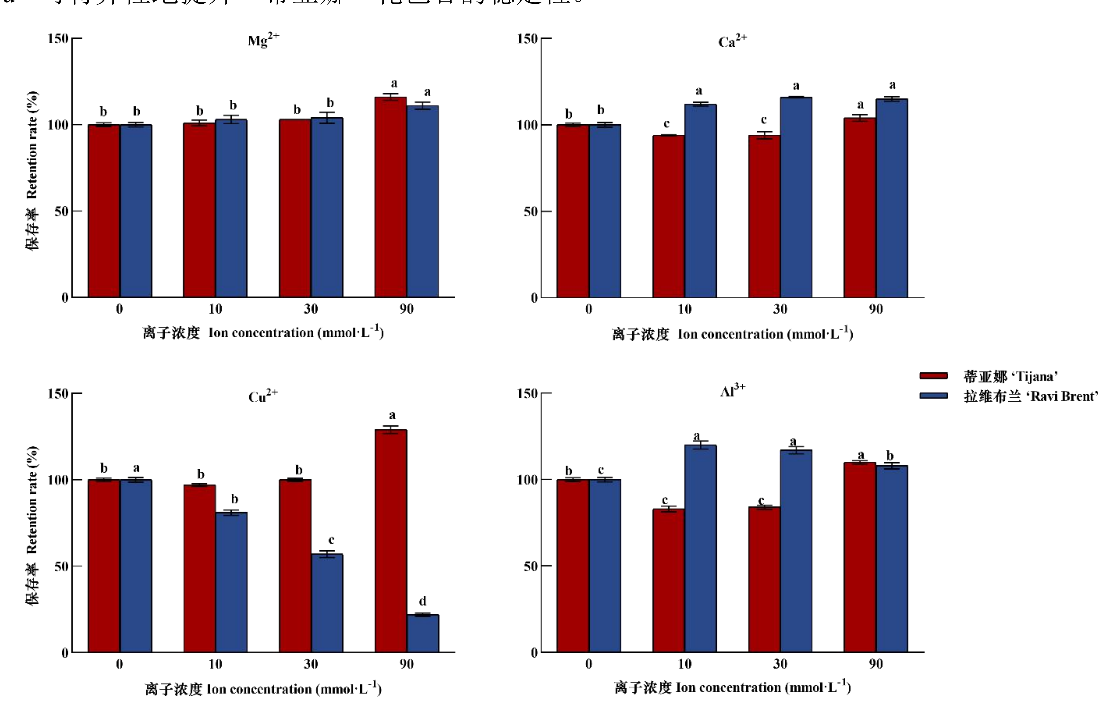


图 7 金属离子对‘拉维布兰’八仙花品种提取液中花色苷最大吸收波长的影响

Fig. 7 Effect of metal ions on the maximum absorption wavelength of ‘Ravi Brent’ *Hydrangea macrophylla*

由图 8 可知，4 种金属离子对两种八仙花花色苷稳定性的影响具有差异性。高浓度（90 mmol·L^{-1}）Mg^{2+}和 Ca^{2+}均有助于提高两者的稳定性；Al^{3+}对‘蒂亚娜’花色苷稳定性的影响呈现先降低、后升高的变化趋势，但显著提升了‘拉维布兰’八仙花花色苷的稳定性。Cu^{2+}对两者的影响效果恰恰相反，其中高浓度时可显著提高‘蒂亚娜’的花色苷稳定性，而使‘拉维布兰’八仙花花色苷的稳定性降至最低，表明 Cu^{2+}可特异性地提升‘蒂亚娜’花色苷的稳定性。



同一品种的小写字母相同者表示在 0.05 水平下差异不显著。下同。

Those with the same lowercase letters of the same variety have no significant differences at the 0.05 level. The same below.

图 8 金属离子对两个八仙花品种提取液中花色苷稳定性的影响

Fig. 8 Effect of metal ions on the stability of anthocyanins of *Hydrangea macrophylla*

2.3.4 糖类

加入 5 种糖类后两个八仙花品种的花色苷溶液颜色均不变；对其进行 500~600 nm 波长范围内的全波长扫描发现，只有加入葡萄糖溶液使‘蒂亚娜’提取液的最大吸收波长变为 565 nm；其他条件下的最大吸收波长仍保持为 540 nm。添加 5 种糖类对‘蒂亚娜’八仙花花色苷的稳定性整体优于‘拉维布兰’八仙花；葡萄糖、麦芽糖、蔗糖、半乳糖和高浓度（8 %~10 %）鼠李糖均可以增加花色不可调的‘蒂亚娜’八仙花花色苷的稳定性；除中高浓度（4 %~10 %）鼠李糖促进花色可调的‘拉维布兰’八仙花花色苷的稳定性、高浓度（10 %）半乳糖破坏其稳定性外，其他 3 种糖类对此均无影响（图 9）。

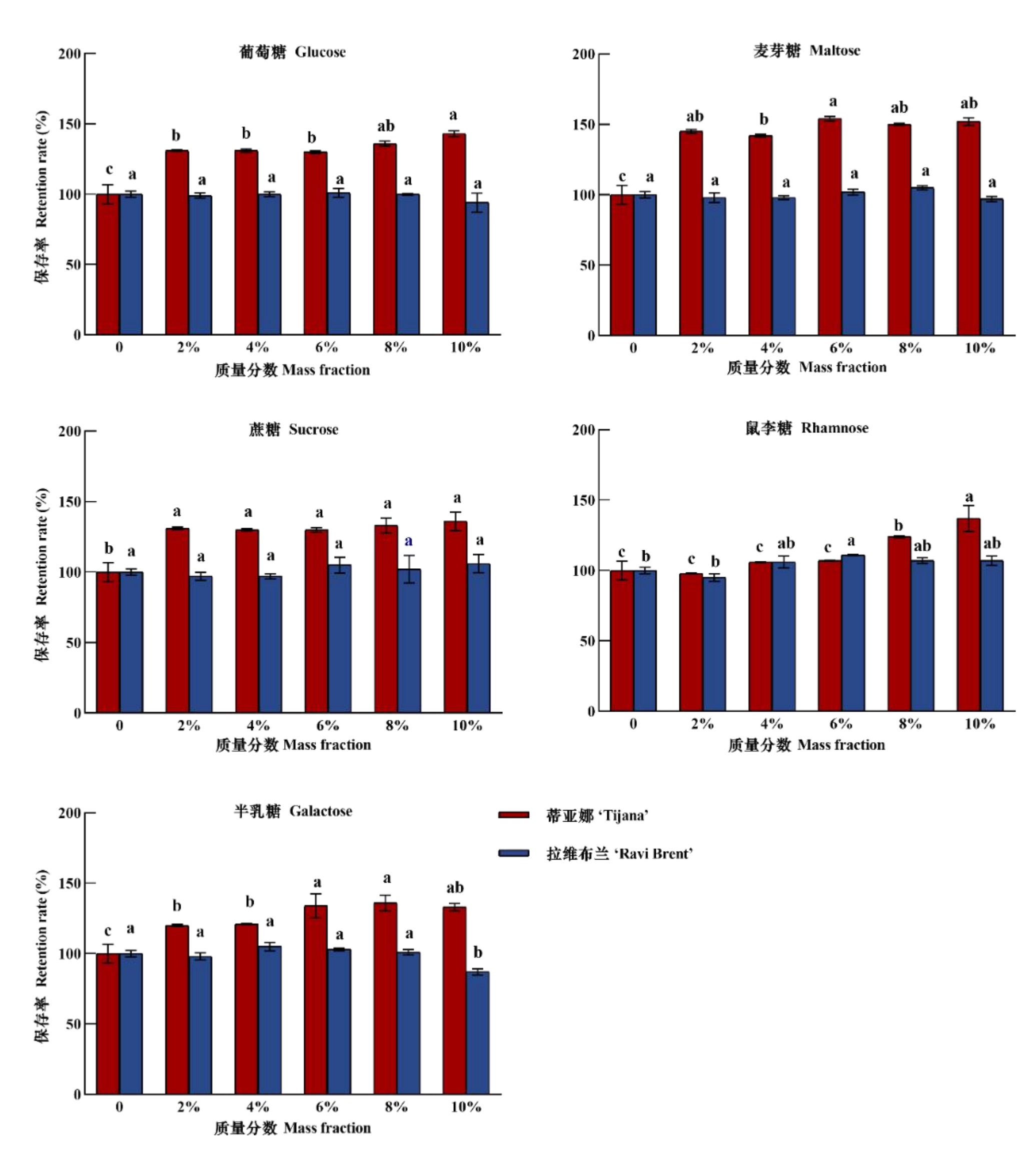


图 9 糖类对两个八仙花品种提取液中花色苷稳定性的影响

Fig. 9 Effects of sugars on the stability of anthocyanins in *Hydrangea macrophylla*

3 讨论与结论

在参考既有研究结果的基础上，作者首先利用正交试验设计优化了八仙花花色苷提取条件，确定了超声波法提取花色苷的最优条件是：‘蒂亚娜’为乙醇（pH 2.0）浓度 70 %，料液比 1∶20，提取时间

20 min；‘拉维布兰’为乙醇（pH 2.0）浓度 80 %，料液比 1∶20，提取时间 20 min，这一结果与刘晓东等（2011）同类研究相比耗时更短，效率更高。除此之外，提取温度、pH 值和提取方法等均会影响花色苷含量，后续可以通过增加多因素、多水平正交试验设计进一步优化提取方法。

作者利用液-质联用法从两个八仙花品种的花色苷提取液中只鉴定出飞燕草素-3-*O*-葡萄糖苷，这一组分与 Hayashi et al.(1953)对粉色和蓝色八仙花的研究结果一致；但龚仲幸等（2017）以矢车菊-3，5-双葡萄糖苷为外标，通过液-质联用法在‘蓝色妈妈’八仙花中检测到了芍药花素-3-葡萄糖苷、飞燕草素-3-葡萄糖苷、飞燕草素-3-戊糖-5-葡萄糖苷等 12 种花色苷，推测这一结果差异除受设备检测条件、添加花色苷混合标样的最低检出限影响外，还可能与采集的八仙花品种、生境与发育阶段有关。

两个八仙花品种具有相同的花色苷主组分，由此判定花色可调性不仅与花色苷种类有关，更重要的是受其结构、稳定性及呈色条件影响。由稳定性分析结果可知：（1）2 个八仙花品种的花色苷在 70 ℃以下均具有较好的热稳定性，在温度≤ 70 ℃保存效果更好。这一结果与贾洪菊（2011）的研究结论一致；这是因为高温会促进花色苷结构中糖苷的水解，从而使其失去对花色素的保护作用，加速花色素的降解（Laleh GH et al., 2006）。（2）八仙花花色苷在避光条件下保存率更高。在粗梗稠李（*Padus napaulensis*）（李晓娇等，2020）、白杜（*Euonymus maackii*）（宋鹏等，2019）等花色苷中也有类似的发现；这是因为光照下花色苷降解符合一级动力学反应，比避光条件下的降解显著加快（Ochoa MR, et al., 2001）。但花色可调的‘拉维布兰’八仙花花色苷较花色不可调的‘蒂亚娜’对光照更敏感，可见花色可调的八仙花花色苷结构更不稳定。（3）葡萄糖、麦芽糖、蔗糖、半乳糖和高浓度（8 %~10 %）鼠李糖均可以增加花色不可调的‘蒂亚娜’八仙花花色苷的稳定性；但只有中高浓度（4 %~10 %）鼠李糖可促进花色可调的‘拉维布兰’八仙花花色苷的稳定性。这些结果表明，花色可调的八仙花花色苷较花色不可调者更不稳定。

当‘拉维布兰’八仙花花色苷加入中低浓度（10~30 mmol·L^{-1}）Al^{3+}后，花色苷稳定性显著提高，颜色由粉色变为蓝色；而‘蒂亚娜’并无此颜色变化，这可能是导致两个八仙花品种花色可调性存在差异的根本原因所在。Kosaku et al.(1985；1990)早期研究发现，3-咖啡酰奎尼酸或 3-对-香豆酰基奎宁酸能够与 Al^{3+}和飞燕草素-3-葡萄糖苷在体外形成蓝色络合物；Oyama et al.(2015)的研究表明也佐证了这一推测，飞燕草素-3-*O*-葡萄糖苷与 Al^{3+}形成了蓝色的复合物，使得部分八仙花萼片由粉色转变为蓝色。在花色不可调的‘蒂亚娜’八仙花中，飞燕草素-3-*O*-葡萄糖苷可能更稳定且不易与 Al^{3+}结合，使花色始终保持粉色；而在花色可调的‘拉维布兰’八仙花中，飞燕草素-3-*O*-葡萄糖苷可能更易与 Al^{3+}螯合形成更稳定的蓝色络合物，使花色由粉色转变为蓝色。

由于本研究仅局限于体外花色苷提取液的部分稳定性影响因素的单一实验，上述研究还有待于通过多因素正交试验设计验证各因素间的交互作用，以及在室外盆栽试验或园林景观绿化工程中开展环境条件与花色苷形成、稳定性及花色可调性机制的研究，为开发八仙花花色可调性提供科学依据。

参考文献

DENG YM, HAN Y, QI XY, et al., 2018. Analysis on germplasm resources of species in *Hydrangea* Linn. and comparisons on their flower color variability and resistance to leaf-spot disease[J]. J Plant Resour Environ, 27(4): 90-100. [邓衍明，韩勇，齐香玉，等，2018. 绣球属植物种质资源分析及其花色可调性和叶斑病抗性比较[J]. 植物资源与环境学报，27(4)：90-100.]

DIAO CW, HU B, HAN Y, et al., 2017. Preliminary study on the effect of Al^{3+} on the color of sepals of different *Hydrangea* varieties[J]. Shanghai Veget, (4): 77-78. [刁春武，胡波，韩勇，等，2017. Al^{3+}对不同八仙花品种萼片颜色的影响初探[J]. 上海蔬菜，(4)：77-78.]

FULEKI T, FRANCIS FJ, 1968. Quantitative methods for anthocyanins. 4. determination of individual anthocyanins in cranberry and cranberry products[J]. J Food Sci, 33(5): 471-478.

GONG ZX, HE Y, YANG J, et al., 2017. Mechanism of exogenous $Al_2(SO_4)_3$ on regulating the anthocyanin concentration in *Hydrangea macrophylla* petal[J]. J Plant Nutr Fertil, 23(3): 821-826. [龚仲幸，何勇，杨静，

等，2017. 外源硫酸铝调节八仙花花青苷组成和含量变化的分子生物学机制[J]. 植物营养与肥料学报，23(3):821-826.]

HAYASHI K, ABE Y, STUDIEN UA, et al., 1953. Papierchromatographische übersicht der anthocyane im pflanzeneich.[J]. Misc Rep Res Inst Nat Resour, 29: 1-8.

JIA HJ, 2011. A research on red *Hydrangea macrophylla* molecular structure and application in pressed flower protecting[D]. Harbin: Northeast Forestry University. [贾洪菊，2011. 八仙花红色素分子结构分析及在压花上应用[D]. 哈尔滨：东北林业大学.]

KODAMA M, TANABE Y, NAKAYAMA M, 2016. Analyses of coloration-related components in *Hydrangea* sepals causing color variability according to soil conditions[J]. Hortic J, 85(4): 372-379.

KOSAKU T, MIYUKI K, HIDEAKI I, 1985. Blueing of sepal color of *Hydrangea macrophylla*[J]. Phytochemistry, 24(10): 2251-2254.

KOSAKU T, TOMOKO Y, AKIHISA T, et al., 1990. Stable blue complexes of anthocyanin-aluminium-3-p-coumaroyl- or 3-caffeoyl-quinic acid involved in the blueing of *Hydrangea* flower[J]. Phytochemistry, 29(4): 1089-1091.

LALEH GH, FRYDOONFAR H, HEIDARY R, et al., 2006. The Effect of light, temperature, pH and species on stability of anthocyanin pigments in four berberis species[J]. Paki J Nutr, 5: 90-92.

Li X, SIDDIQUE F, SILVA G, et al., 2019. Quantum chemical evidence for the origin of the red/blue colors of *Hydrangea macrophylla* sepals[J]. N J Chem, 43: 7532-7540.

LI XJ, HE JM, HAN DX, et al., 2020. Study on the extraction, physical and chemical properties and stability of anthocyanins from *Padus napaulensis*[J]. Food Ferment Ind, 46(15): 208-215. [李晓娇，何健民，韩德仙，等，2020. 粗梗稠李中花色苷的提取及其理化性质和稳定性研究[J]. 食品与发酵工业，46(15)：208-215.]

LIU XD, JIA HJ, LIU XH, 2011. Red pigment extracted from *Hydrangea* paniculate and its stability[J]. J NE For Univ, 39(5): 62-63. [刘晓东，贾洪菊，刘香环，2011. 圆锥八仙花红色素提取及稳定性[J]. 东北林业大学学报，39(5)：62-63.]

OCHOA MR, KESSELER AG, DE MA, et al., 2001. Kinetics of colour change of raspberry, sweet (*Prunus avium*) and sour (*Prunus cerasus*) cherries preserves packed in glass containers: light and room temperature effects[J]. J Food Eng, 49(1): 55-62.

OYAMA K, YAMADA T, Ito D, et al., 2015. Metal complex pigment involved in the blue sepal color development of *Hydrangea*[J]. J Agric Food Chem, 63: 7630-7635.

SCHREIBER HD, JONES AH, LARIVIERE CM, et al., 2011. Role of aluminum in red-to-blue color changes in *Hydrangea macrophylla* sepals[J]. Biometals, 24(6): 1005-1015.

SONG P, DING YF, XU ZH, et al., 2019. Studies on extraction, stability and composition of anthocyanins from leaves of *Euonymus maackii*[J]. N Hortic, (24): 81-87. [宋鹏，丁彦芬，徐子涵，等，2019. 丝棉木叶片花色苷的提取、稳定性和成分研究[J]. 北方园艺，(24)：81-87.]

PARK S, ARASU MV, NAN J, et al., 2014. Metabolite profiling of phenolics, anthocyanins and flavonols in cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata*) [J]. Ind Crops Products, 60: 8-14.

SUN W, LI CH, WANG LS, et al., 2010. Analysis of anthocyanins and flavones in different-colored flowers of Chrysanthemum[J]. Chin Bull Bot, 45(3): 327-336. [孙卫，李崇晖，王亮生，等，2010. 菊花不同花色品种中花青素苷代谢分析[J]. 植物学报，45(3)：327-336.]

XU WX, LIU J, 2020. Optimization of Ultrasonic-assisted extraction process of pigment from flowers of *Robinia pseudoacacia* L. [J]. Sci Technol Food Ind, 41(10): 157-162+169. [徐文秀，刘俊，2020. 超声波辅助提取紫槐花色素工艺优化[J]. 食品工业科技，41(10)：157-162+169.]

YANG J, SHEN WH, ZHANG RJ, et al., 2019. Study on the regulation and control of *Hydrangea* flower color by Aluminum Sulfate[J]. Shanghai Agric Sci Technol, (3): 82-83. [杨娟，沈卫红，张睿婧，等，2019. 硫酸铝对八仙花花色的调控研究[J]. 上海农业科技，(3)：82-83.]

YOSHIDA K, D I, MIKI N, et al., 2021. Single‐cell analysis clarifies mosaic color development in purple *Hydrangea* sepal[J]. New Phytol, 229: 3549-3557.

YU JJ, TANG DQ, LI X. Anthocyanin compositions in petals of *Freesia hybrida*[J]. Guihaia, 2020, 40(5): 687-695. [郁晶晶，唐东芹，李欣，2020. 香雪兰花瓣的花色苷组成[J]. 广西植物，40(5)：687-695.]

ZAN LF, WANG GX, YE J, et al., 2017. Optimization of extraction process and stability of yellow thorn rose anthocyanin[J]. Jiangsu Agric Sci, 45(22): 221-224. [昝立峰，王更先，叶嘉，等，2017. 黄刺玫花色素的提取工艺优化及其稳定性[J]. 江苏农业科学，45(22)：221-224.]

ZUO Y, TIAN F, 2014. The direction of research and development of the stability of anthocyanins[J]. Cereals Oils, 27(7): 1-5. [左玉，田芳，2014. 花青素稳定性研究进展[J]. 粮食与油脂，27(7)：1-5.]